دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
نشریه پژوهش‌های تولید گیاهی
جلد بیست و یکم، شماره چهارم، ۱۳۹۳
http://jopp.gau.ac.ir

# تغییرات فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین‌آمونیا لیاز (PAL) کنگرفرنگی (*Cynara scolymus* L.) تحت تأثیر متیل جاسمونات و اسید سالیسیلیک در شرایط درون شیشه‌ای

*صغری صمدی[۱]، عظیم قاسم‌نژاد[۲] و مهدی علیزاده[۲]
[۱]دانشجوی کارشناسی‌ارشد، گروه علوم باغبانی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان،
[۲]استادیار، گروه علوم باغبانی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۱۱/۱۵ ؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۶/۵

## چکیده

در پژوهش حاضر اثر محرک‌های اسیدسالیسیلیک (SA) و متیل جاسمونات (MeJA) بر فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیاز (PAL)، محتوای فنلی و فلاونوئیدی کالوس کنگرفرنگی مورد بررسی قرارگرفت. طبق نتایج حاصله تغییرات فعالیت آنزیم PAL، محتوای فنلی و فلاونوئیدی تحت تأثیر نسبت‌های مختلف محرک قرار داشته و نسبت به هم همبستگی مثبتی نشان دادند. که بیان‌گر نقش مستقیم PAL در تولید ترکیبات فنیل پروپانوییدی است. حداکثر میزان فنل کل و فلاونوئید در نمونه‌های تیمار شده با ۱۰۰ میکرومولار متیل جاسمونات (MeJA) مشاهده شد. با افزایش غلظت متیل جاسمونات از این مقدار محتوای فنیل پروپانوئیدی کاهش یافت. با افزایش اسیدسالیسیلیک (SA) نیز تجمع ترکیبات فنیل پروپانوئیدی افزایش یافت. البته بین تیمارهای ۱۰۰، ۲۰۰ و ۲۵۰ میکرومولار SA اختلاف معنی‌داری وجود نداشت. و اثر متقابل SA+MeJA نیز کاملا معنی‌دار بوده به‌طوری که در غلظت‌های 100SA + 50MeJA و 50SA + 50MeJA میکرومولار حداکثر میزان ترکیبات فنلی به‌دست آمد. البته فعالیت آنزیم تحت تأثیر تیمارهای محرک در غلظت بالا کاهش قابل توجه‌ای نشان داد. همبستگی مثبت فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز (PAL) و تجمع ترکیبات فنلی بیان‌گر نقش کلیدی PAL در بیوسنتز ترکیبات فنلی در گیاه کنگرفرنگی است. با توجه به‌نتایج به‌دست

*مسئول مکاتبه: soghra.samadi@yahoo.com

آمده بیان می‌شود که آنزیم PAL به‌عنوان اولین و مهم‌ترین آنزیم دخیل در تولید ترکیبات پلی‌فنلی تحت تأثیر تیمارهای اعمال شده قرار داشته و با بهینه‌سازی غلظت محرک‌ها، می‌توان تولید متابولیت‌های ثانویه دلخواه در کنگر فرنگی در شرایط درون شیشه‌ای تحت تأثیر قرار داد.

***واژه‌های کلیدی***: آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیاز (PAL)، اسیدسالیسیلیک، فلاونوئید، فنل کل، متیل جاسمونات

**مقدمه**

استفاده از الیسیتورها (محرک‌های تولید متابولیت ثانویه) روش مناسبی برای افزایش سطح تولید متابولیت‌های ثانویه است. این ترکیبات نقش مهمی در چرخه تولید متابولیت‌های ثانویه ایفا می‌کنند (احمدی مقدم و همکاران، ۲۰۱۳). اسیدسالیسیلیک و متیل جاسمونات دو نمونه از محرک‌های طبیعی بی‌خطری هستند که به‌عنوان ترکیبات محرک تولید متابولیت‌های ثانویه از طریق القاء تنش کاذب عمل می‌نمایند (وانگ و همکاران، ۲۰۰۹؛ دیویا و همکاران، ۲۰۱۳).

اسیدسالیسیلیک از ترکیبات فنلی موجود در گیاهان بوده که رشد و نمو، میزان تنفس، فتوسنتز، جذب و انتقال یون‌ها را تحت تأثیر قرار داده و تغییراتی را در ریخت‌شناسی برگ و ساختار کلروفیل ایجاد می‌کند (پوپووا و همکاران، ۲۰۰۳). اسیدجاسمونیک یک هورمون درون‌زای گیاهی است که نقش کلیدی در واکنش‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی داشته و سبب تجمع برخی از پروتئین‌های درون سلولی موسوم به IIPS (پروتئین‌های غشای تیلاکوئید) شده که این پروتئین‌ها به پروتئین‌های حاصله از تنش‌های اسیدآبسیزیک و NaCl بسیار شبیه است. تصور می‌شود که استفاده خارجی از این ترکیبات نیز می‌تواند به‌عنوان یک عامل استرس‌زا مؤثر باشد. اسیدسالیسیلیک و متیل جاسمونات شرایط تنش را در گیاه القا کرده و به‌عنوان یک سیگنال درونی در پاسخ به استرس‌های زنده و غیر زنده مانند پاتوژن‌ها، اشعه‌ی UV، شوری و کم آبی عمل کرده (پوپووا و همکاران، ۲۰۱۳) و همچنین سبب تجمع متابولیت‌های ثانویه می‌گردند که برایند همه این فعالیت‌ها مقاومت به تنش است (پوپووا و همکاران، ۲۰۱۳). این ترکیبات بخشی از راه کار دفاعی گیاه در برابر تنش محسوب می‌گردند. در واقع SA و MeJA با تأثیر آنتاگونیستی و سینرژیتی در تنظیم ژن پروتئین‌های وابسته به تنش و در

نتیجه افزایش تولید نقش دارند (گاندلاچ و همکاران، ۱۹۹۲؛ مانگسری ماندی و همکاران، ۲۰۱۱؛ رامان و راوی، ۲۰۱۱).

فنیل آلانین آمونیا لیاز (PAL) آنزیم اصلی در اتصال مسیر سنتزی اسیدهای آمینه آروماتیک و متابولیت‌های ثانویه شامل گروه وسیعی از ترکیبات فنلی است و نقش کلیدی در تنظیم محصولات حاصل از مسیر فنیل پروپانوئیدی ایفا می‌کند. فعالیت آنزیم PAL تحت تأثیر مرحله رشد، تمایزیابی سلول و همچنین استرس‌های زنده و غیرزنده تغییر می‌کند، به‌طوری‌که بیان شده است آلودگی به بیمارگر، زخم‌های مکانیکی، تابش UV، خشکی، اسیدسالیسیلیک و متیل جاسمونات سبب افزایش فعالیت PAL می‌شوند. مسیر فنیل پروپانوئیدی، مسیر اولیه تولید بسیاری از ترکیبات طبیعی مانند هیدروکسی سینامیک‌اسیدها و سپس فلاونوئیدها، ایزوفلاونوئیدها، لیگنین، کومارین، استیلبن و طیف وسیعی از سایر مواد فنلی است. این ترکیبات در گیاه نقش‌های مهمی چون حفاظت در برابر استرس‌های زنده و غیر زنده، سیگنال‌های بین سلولی، محافظت در برابر نور و به‌ویژه UV و همچنین حفاظت‌های مکانیکی را به‌عهده دارند. در واقع PAL امکان تبدیل فنیل آلانین به ترانس- اسید سینامیک را فراهم ساخته و سبب ادامه چرخه و تولید مواد فنلی می‌شود. ترانس- اسید سینامیک پیش ماده اصلی تولید فلاونوئیدها و لیگنین‌هاست و بنابراین افزایش فعالیت PAL سبب افزایش سطح تولید مواد فنیل پروپانوئیدی می‌گردد (باگال و همکاران، ۲۰۱۲).

کنگرفرنگی (*Cynara scolymus*) به‌عنوان یکی از غذاهای محبوب در رژیم‌های غذایی نواحی مدیترانه، سرشار از ترکیبات پلی‌فنلی، اینولین، فیبر و عناصر معدنی است، این گیاه نقش مهمی در کاهش کلسترول و مشکلات کبدی، کاهش ابتلا به سرطان و بیماری‌های قلبی داشته و بالاترین میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی در میان سبزیجات را دارا می‌باشد. در واقع کنگر فرنگی غذایی گیاهی است که علاوه بر ارزش تغذیه‌ای فراوان نقش مهمی در پیشگیری بسیاری از بیماری‌ها دارد (سکارلی و همکاران، ۲۰۱۰؛ ضیائی و همکاران، ۲۰۰۵). این پژوهش با هدف بررسی استفاده خارجی الیسیتورهای طبیعی اسیدسالیسیلیک و متیل جاسمونات بر تغییرات ترکیبات آنتی‌اکسیدانی کنگرفرنگی انجام شد.

## مواد و روش‌ها

**استقرار ریزنمونه در محیط کشت:** برای انجام پژوهش، بذرهای کنگرفرنگی (*Cynara scolymus*) رقم گرین گلوب از مزرعه دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان جمع‌آوری شده و پس از استرلیزاسیون در محیط MS با غلظت ۱/۲ (موراشیگ و اسکوگ، ۱۹٦۲) کشت گردید. پس از تشکیل برگ‌های کوتیلدونی نمونه‌های گیاهی رشد یافته در محیط درون شیشه‌ای، به‌صورت ریز نمونه، به محیط کشت MS حاوی ۲ میلی‌گرم بر لیتر بنزیل آدنین و ۵ میلی‌گرم بر لیتر نفتالین اسیداستیک جهت کالوس‌زایی انتقال داده شد و سپس کالوس‌ها (سبز رنگ) به محیط‌های کشت حاوی تیمارهای متیل جاسمونات و اسیدسالیسیلیک در غلظت‌های ۰، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۲۵۰ میکرومولار انتقال یافتند. پس از ٤ هفته اندازه‌گیری‌های مربوطه روی کالوس‌ها انجام شد.

**فنل کل:** سنجش فنل کل به روش فولین سیوکالتیو انجام شد (اسلینکارد و سینگلتون، ۱۹۷۷). ۱۰ میکرولیتر از عصاره متانولی (۰/۲۵ گرم در ۲/۵ میلی‌لیتر متانول ۸۰ درصد) با ۵۰ میکرولیتر فولین سیوکاتیو و ۵۸۰ میکرولیتر آب مقطر مخلوط شده و پس از ۵ تا ۸ دقیقه استراحت، ۱۵۰ میکرولیتر کربنات سدیم ۱ مولار به آن اضافه گردید. سپس محلول فوق به‌مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی و حمام بخار ٤۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفته و در طول موج ۷٦۵ نانومتر قرائت شد. برای شاهد نیز به‌جای عصاره از متانول ۸۰ درصد استفاده شد.

**فلاونوئید کل:** سنجش محتوی فلاونوئیدی به روش آلومینیوم کلراید انجام شد (چانگ و همکاران، ۲۰۰۲). ۰/۵ میلی‌لیتر از عصاره متانولی تهیه شده با ۱/۵ میلی‌لیتر متانول، ۰/۱ میلی‌لیتر آلومینیوم کلراید ۱۰ درصد در اتانول (۱۰ گرم آلومینیوم کلراید در ۱۰۰ میلی‌لیتر اتانول و آب مقطر) ۰/۱ میلی‌لیتر استات پتاسیم یک مولار و ۲/۸ میلی‌لیتر آب مقطر مخلوط شد. سپس مخلوط نیم ساعت در تاریکی قرار داده شد و در نهایت در طول موج ٤۱۵ نانومتر قرائت گردید. برای شاهد به‌جای عصاره از متانول خالص استفاده شد.

**آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیاز (PAL):** برای سنجش فعالیت آنزیم PAL از روش ساندرز و امکلار (۱۹۷٤) با کمی تغییر استفاده شد. ۰/۱ گرم از بافت کالوس با استفاده از ۱ میلی‌لیتر بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار pH=۷ کوبیده شد سپس به‌مدت ۱۵ دقیقه در ۱٤۰۰۰ دور در دقیقه در دمای $٤^{\circ}C$ سانتریفیوژ شد و پس از اتمام سانتریفیوژ از عصاره رویی برای سنجش آنزیم استفاده شد. محتوی نمونه برای سنجش آنزیم حاوی ۲۵۰ میلی‌لیتر عصاره آنزیمی ۲۵۰ میلی‌لیتر بافربورات سدیم ۱۰ مولار (pH=۸/۸)، ۲۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر به اضافه ۲۵۰ میلی‌لیتر بافر سوبسترای فنیل آلانین (۵۰ میلی‌مولار)

بود. سپس جذب آن در طول موج ۲۹۰ نانومتر و توسط دستگاه اسپکترفتومتر مدل UV2800 قرائت شد. محاسبه فعالیت آنزیم PAL با استفاده از قانون بیرلامبرت و با ضریب خاموشی ($1.cm^{-1}$– ۹۶۳۰μ) و بر حسب n mol g Fw min انجام گردید. این آزمایش در غالب طرح فاکتوریل بر پایه کاملاً تصادفی انجام شد و نتایج با استفاده از نرم‌افزار SPSS17 و آزمون LSD تجزیه و تحلیل گردید.

## نتایج و بحث

مطابق با جدول تجزیه واریانس (جدول ۱) تأثیر تیمارهای متیل جاسمونات و اسید سالیسیلیک به تنهایی و به‌صورت ارتباط متقابل بر محتوی فنل کل، فلاونوئید و فعالیت آنزیم PAL در سطح ۱ درصد کاملاً معنی‌دار بود.

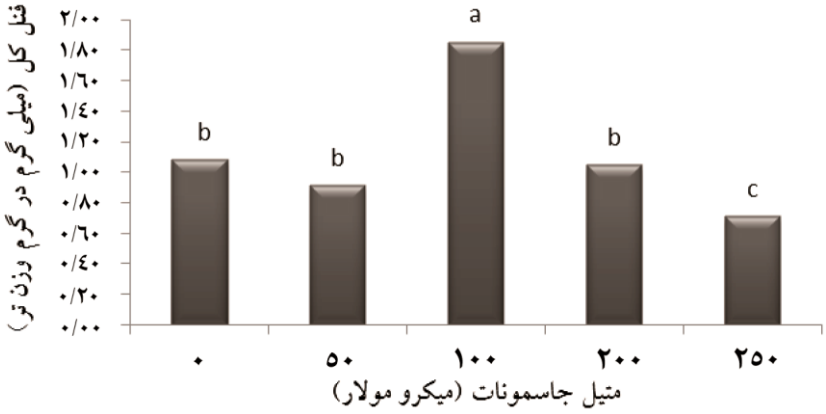
**جدول ۱- تجزیه واریانس اثر اسیدسالیسیلیک و متیل جاسمونات بر میزان فنل، فلاونوئید و فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیاز.**

| | | میانگین مربعات | | |
|---|---|---|---|---|
| منابع تغییر | درجه آزادی | فنل | فلاونوئید | فنیل آلانین آمونیالیاز |
| اسیدسالیسیلیک | ٤ | ۰/۰۲۰* | ۱۰٦/۰۸۱** | ۰/۲۸۹** |
| متیل جاسمونات | ٤ | ۰/۰۲۷** | ۱۱۵/٦۹٤** | ۰/٤۹۷** |
| اسیدسالیسیلیک × متیل جاسمونات | ۱٦ | ۰/۰۳۳** | ۳۰۷/۲۵۳** | ۱/٦۱٤** |
| اشتباه آزمایش | ۵۰ | ۰/۰۰٤ | ۸/۷۹۲ | ۰/۰۵٤ |

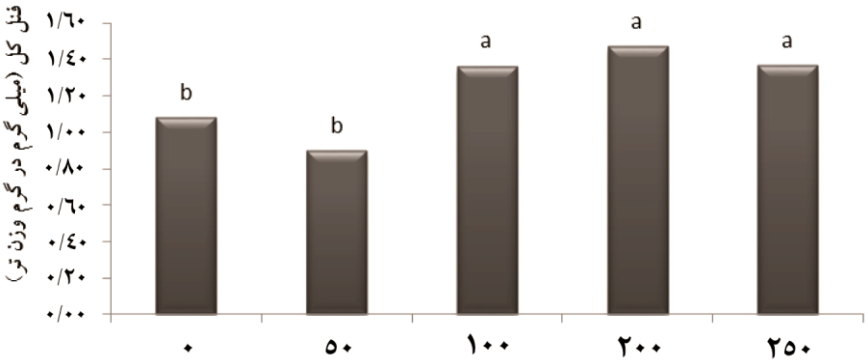
* معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد، ** معنی‌دار درسطح احتمال ۱ درصد.

بررسی اثر متیل جاسمونات بر محتوای فنلی کالوس (شکل ۱) نشان داد که در غلظت‌های صفر تا ۱۰۰ میکرومولار میزان ترکیبات فنلی افزایش و در ۱۰۰ تا ۲۵۰ میکرومولار کاهش می‌یابد که می‌تواند به‌دلیل محدود بودن توانمندی سلول‌ها در پاسخ به عامل تنش‌زا و یا کاهش فعالیت آنزیم‌ها توسط آن، ایجاد گردد. محتوی فنلی در ۱۰۰ میکرومولار در حداکثر مقدار بوده و نسبت به نمونه شاهد افزایش سه برابری نشان داد. جالب این‌که با افزایش بیشتر غلظت متیل جاسمونات نه تنها افزایش تجمع فنل مشاهده نشد، بلکه روند تجمع فنل کاهش یافت تا جایی‌که میزان فنل کل نمونه‌هایی که با ۲۵۰

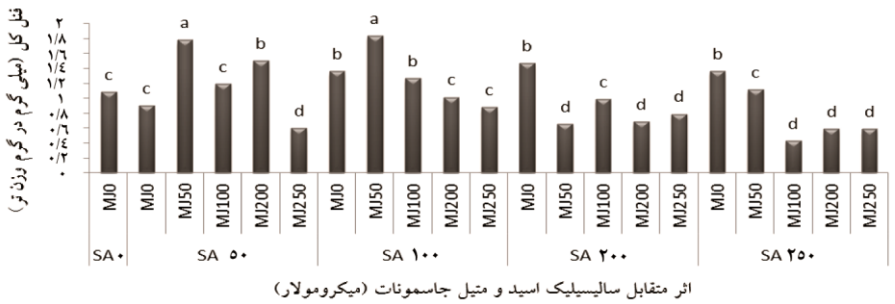
میکرومولار متیل جاسمونات تیمار شدند، از نمونه شاهد نیز کمتر بود. برخلاف متیل جاسمونات، میزان فنل کل تحت تأثیر اسیدسالیسیلیک افزایش نشان داد (شکل ۲). به‌طوری که با افزایش غلظت این ترکیب تا ۱۰۰ میکرومولار، میزان محتوی فنلی نسبت به دو سطح تیمار شده قبلی، افزایش معنی‌داری نشان داد. با این وجود سطوح بالاتر از ۱۰۰ تفاوت معنی‌داری با هم و همچنین با ۱۰۰ میکرومولار ایجاد نکرده‌اند.




**شکل ۱- تأثیر متیل جاسمونات بر محتوای فنل کل در کالوس‌های تیمار شده.**



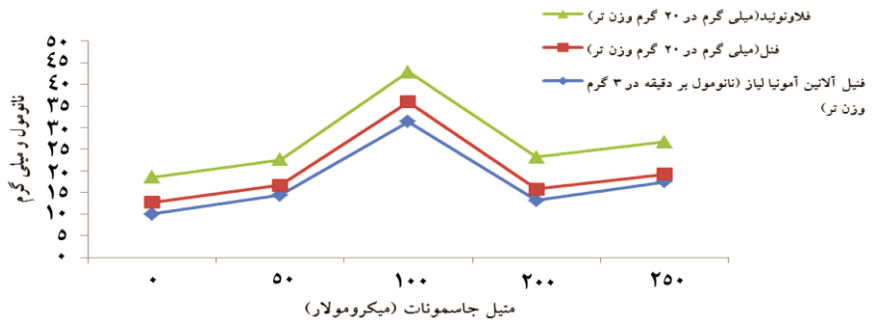

**شکل ۲- تغییر محتوی فنل کل در کالوس‌های تیمار شده، تحت تأثیر اسیدسالیسیلیک.**



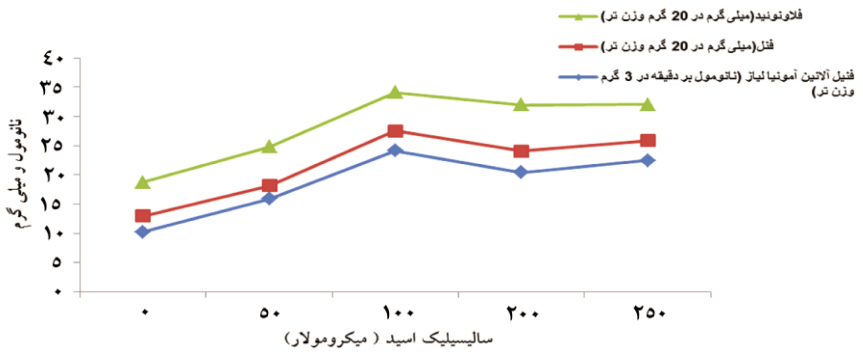

**شکل ۳- بررسی روند تغییرات فنل کل تحت تأثیر اثر متقابل متیل جاسمونات و سالیسیلیک‌اسید.**

همان‌گونه که در شکل ۳ آمده است، اثر متقابل متیل جاسمونات و اسیدسالیسیلیک بر تغییر ترکیبات فنلی تفاوت معنی‌داری داشته است. به‌طوری که تیمارهای اسیدسالیسیلیک ۵۰ میکرومولار و متیل جاسمونات ۵۰ میکرومولار و اسیدسالیسیلیک ۱۰۰ میکرومولار و متیل جاسمونات ۵۰ میکرومولار حداکثر محتوای فنیل پروپانوییدی را داشته است. همچنین با افزایش غلظت الیسیتور کاهش قابل توجه‌ای در سطح فنل کل مشاهده شده است.

**تغییرات فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیاز (PAL):** در این آزمایش افزایش غلظت متیل جاسمونات (شکل ٤) تا سطح ۱۰۰ میکرومولار سبب افزایش محتوای فنل و فلاونوئید و غلظت‌های بیشتر سبب کاهش آن شد. روند تغییر ترکیبات فنیل پروپانوییدی با آنزیم فنیل‌آلانین آمونیا لیاز همبستگی مثبت داشته و با افزایش فعالیت آنزیم محتوای فنلی و فلاونوئیدی نیز افزایش یافت.

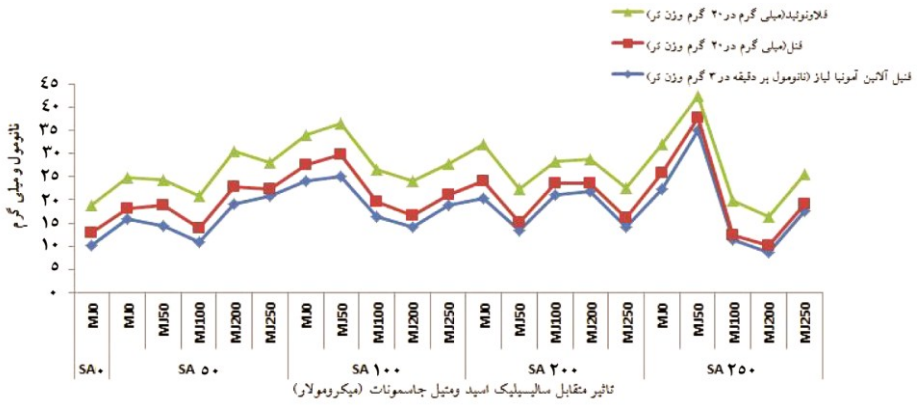



**شکل ٤- تغییرات فنل، فلاونوئید و آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز تحت تأثیر تیمار متیل جاسمونات.**




**شکل ٥- تأثیر اسیدسالیسیلیک بر روند تغییرات فنل، فلاونوئید و آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز.**

افزایش غلظت اسیدسالیسیلیک (SA) تا سطح ۲۵۰ میکرومولار سبب افزایش محتوی فنلی و فلاونوئیدی شد. بین غلظت‌های ۱۰۰، ۲۰۰ و ۲۵۰ میکرومولار اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. با این وجود نمونه‌هایی که تحت تأثیر تیمار ۲۵۰ میکرومولار اسیدسالیسیلیک قرار داشتند، بیشترین میزان تغییرات را از نظر عددی نشان دادند. البته همان‌گونه که در شکل ٤ و ٥ آمده است روند فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز (PAL) با غلظت الیسیتورهای مصرف شده ارتباط مستقیم داشت. به‌طوری که با افزایش میزان اسیدسالیسیلیک روند تغییرات فعالیت آنزیم با فنل کل و فلاونوئید یکسان بود (شکل ٥). این تغییرات با اعمال متیل جاسمونات نیز روند مشابه‌ای داشته و از وضوح بیشتری برخوردار است (شکل ٤).




**شکل ٦- روند تغییرات فنل، فلاونویید و آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز تحت تأثیر اثر متقابل اسیدسالیسیلیک و متیل جاسمونات.**

همان‌گونه که در شکل ٦ نشان داده شده است، در مقایسه با شاهد تغییرات فنل، فلاونوئید و همچنین فعالیت آنتی‌اکسیدانی تحت تأثیر اثر متقابل متیل جاسمونات و اسیدسالیسیلیک قرار داشته و تغییرات آنزیم تحت تأثیر تیمار تغییرات مشابه‌های در میزان ترکیبات به‌ویژه فنل داشته است. بررسی‌ها نشان می‌دهد میزان فنل به‌شدت تحت تأثیر میزان فعالیت آنزیم قرار داشت. اگرچه این تغییرات در مورد فلاونوئید نیز مشابه بود، اما عدم همراهی تغییرات فلاونوئید با فعالیت آنزیم مشاهده شد.

ترکیبات فنیل پروپانوییدی گیاهان را در مقابل گیاهخواران، بیمارگرها و تنش‌های غیرزنده حفظ نموده و با جذب حشرات گرده افشان بقاء نسل گیاه را تضمین می‌کنند. در اکثر گونه‌های گیاهی مرحله کلیدی ساخت این مواد، تبدیل فنیل آلانین به اسید سینامیک از طریق حذف یک مولکول آمونیاک انجام می‌شود. این واکنش به کمک آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیاز (PAL) که یکی از آنزیم‌های مهم تنظیم‌کننده متابولیسم ثانویه است، کاتالیز می‌گردد. فعالیت PAL در گیاهان تحت کنترل عوامل داخلی و خارجی مانند هورمون‌ها، میزان مواد غذایی، نور (از طریق تأثیر بر فیتوکروم‌ها) آلودگی‌های قارچی و زخم‌ها قرار دارند. در واقع ترکیبات فنلی در گیاه در مواجه با استرس‌های زنده و غیرزنده تجمع می‌یابند که ناشی از القای بسیار سریع بیان ژن PAL است. محرک یا الیسیتور اغلب عبارتند از ترکیبات ویژه‌ای که از طریق القای استرس کاذب سبب فعال شدن راهبرد دفاعی گیاه و در نتیجه تولید متابولیت ثانویه می‌شوند. به‌عنوان مثال حمله قارچ سبب نسخه‌برداری mRNAیی که PAL را کد می‌کند شده و ساخت PAL و به تبع آن ساخت متابولیت‌های ثانویه در گیاه افزایش می‌یابد (کانگ و سالت ویت، ۲۰۰۳؛ شبانی و همکاران، ۲۰۰۹؛ ون و همکاران، ۲۰۰۵). اسیدسالیسیلیک و متیل جاسمونات به‌عنوان ترکیبات القاء کننده تنش مسیر سیگنالینگ را فعال نموده و با افزایش رونویسی از mRNA خاص PAL سبب افزایش تولید ترکیبات فنولیک شده که این ترکیبات با استرس القا شده مقابله می‌کنند.

بسیاری از مطالعات نشان می‌دهند که افزودن اسیدسالیسیلیک و متیل جاسمونات خارجی با اتصال به گیرنده‌های غشا سبب تولید اکسیژن‌های فعال، NO، پروتئین کینازها، اسیدسالیسیلیک و متیل جاسمونات می‌شود (رامان و همکاران، ۲۰۱۱؛ اندی و همکاران، ۲۰۰۱). با تأثیر مستقیم این تغییرات بر رونویسی ژن‌ها و آنزیم‌های دخیل در ساخت متابولیت‌های ثانویه سبب افزایش تولید این ترکیبات می‌شوند. این ترکیبات خود به‌طور مستقیم به‌عنوان عامل دفاعی عمل نمی‌کنند بلکه با فعال‌سازی مسیرهای تولید متابولیت‌های ثانویه سبب حفاظت از گیاه در برابر استرس‌های زنده و غیرزنده می‌شوند. متیل جاسمونات و اسیدسالیسیلیک مسیر سیگنالینگ اختصاصی داشته، اما هر کدام از آن‌ها

قابلیت بازدارندگی و یا تحریک‌کنندگی بر همدیگر را دارند. برخی از مطالعات عامل اصلی این ارتباط را هورمون اتیلن می‌دانند. در واقع متیل جاسمونات و اسید سالیسیلیک با تأثیر بر آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز سبب فعالسازی مسیر فنیل پروپانوئیدی و افزایش تولید ترکیبات فنلی می‌شوند (ون و همکاران، ۲۰۰۵؛ وانگ و همکاران، ۲۰۰۹). بررسی‌ها نشان داده است که متیل جاسمونات در رونویسی ژن‌هایی بازدارنده‌ی پروتئینازها، آنزیم های مؤثر در بیوسنتز فلاونوئیدها و لیپواکسیژنازها که همه آن‌ها سبب ایجاد مقاومت گیاه در برابر انواع استرس‌ها می‌شوند، مؤثرند. در پاسخ به آلودگی‌های قارچی متیل جاسمونات سنتز آنزیم PAL و چاکلون سنتاز را فعال می‌کند که بسیاری از ترکیبات دفاعی از این متابولیت‌ها مشتق می‌شوند. مطالعات نشان می‌دهند که متیل جاسمونات‌ها نقش مؤثری در افزایش پاکلی تاکسول در سرخدار، جنسینوساید در جنسینگ (*Panax ginsing*) (لئونارد و همکاران، ۲۰۰۳) آنتوسیانین و مواد فنلی در سیب (رودل و همکاران، ۲۰۰۲) و توت‌فرنگی (آیالازارلا و همکاران، ۲۰۰۵) سیلی مارین در ماریتیغال (سانچز- سانپدرو و همکاران، ۲۰۰۵) اسید رزمارینک در *Coleus blumei* (اسزابو و همکاران، ۱۹۹۹)، هایپرسین در علف چای *Hypericum perforatum* (والکر و همکاران، ۲۰۰۲)،گلیسیریزین در شیرین‌بیان (وانگ ویچا و همکاران، ۲۰۱۱) شده و همچنین افزایش فعالیت آنزیم PAL در محیط کشت تنباکو (اندی وهمکاران، ۲۰۰۱) سویا (گاندلاچ و همکاران، ۱۹۹۲) افزایش فعالیت آنزیم PAL و قند کل در میوه گواوا (گونزاتا و همکاران، ۲۰۰٤) افزایش فعالیت آنزیم PAL، فنل کل، فلاونوئیدها، آنتوسیانین‌ها و سطح آنتی‌اکسیدانی در بلوبری نیز گزارش شده است (وانگ و همکاران، ۲۰۰۹).

اسیدسالیسیلیک نیز به‌عنوان یک محرک طبیعی سبب سنتز آنزیم‌های دفاعی گیاه از قبیل β-۱-۳-گلوکوناز (هضم دیواره سلولی قارچ‌ها) و لیپواکسیژناز (آنزیم اصلی مسیر بیوسنتزی اسید جاسمونیک) (آبشار پیام‌رسانی وابسته به یون‌ها Ca++ و MaP کینازها) می‌شود. همچنین افزایش فعالیت آنزیم‌هایی مانند PAL، TAT، CAT، SOD و تجمع ترکیبات فنلی، افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی در کشت بافت گیاه مریم گلی (دانگ و همکاران، ۲۰۱۰) افزایش فعالیت PAL در جعفری، مرکبات و انگور (لافانتی و همکاران، ۲۰۰۷؛ چن و همکاران، ۲۰۰٦؛ تالک و کنراث، ۱۹۹۸) و افزایش سطح کارتنوئید کل، β-کاروتن، لوتئین، کلروفیل، فنل کل و اسید کلروژینک در گیاه گشنیز (دیویا و همکاران، ۲۰۱۳) تحریک فعالیت β-۱ و ۳-گلوکاناز، PAL و پروکسیداز (Pod) در گیلاس (یائو و همکاران، ۲۰۰۵) گزارش شده است.

## نتیجه‌گیری

ترکیبات ثانویه گیاهان دارویی برای اهداف غذایی و درمانی دارای اهمیت‌اند. لـذا هـر عـاملی کـه بتواند ضمن ایجاد کمترین تغییر در ساختار ژنتیکی گیاه تولید این ترکیبات را افـزایش دهـد بـا ارزش خواهد بود. در مقایسه با گیاهان دست نخـورده، سـلول‌هـا و بافـت‌هـا بـرای مطالعـه تغییـرات تولیـد متابولیت‌ها قابلیت بیشتری دارند. در این آزمایش نشان داده شد که محرک‌ها با تأثیر بـر بیـان و میـزان فعالیت آنزیم‌های کاتالیزکننده متابولیت‌های ثانویه سبب افزایش ایـن ترکیبـات در بافـت کشـت شـده می‌شوند. اما نکته مهم این است که افزایش تولید متابولیت‌ها نه تنها تحت تأثیر فعالیت آنزیم، بلکه بـه غلظت محرک محیط نیز بستگی دارد. افزایش محرک بیش از حد معمول نه تنهـا افـزایش متابولیـت را در بر ندارد، بلکه از طریق کاهش فعالیت آنـزیم (احتمـالا از طریـق کـاهش بیـان ژن مربوطـه) تولیـد متابولیت‌ها را کم و یا متوقف می‌سازد. بنابراین با بهینه‌سازی غلظت محرک و ترکیبات غـذایی محـیط کشت می‌توان بدون دستکاری در ساختار ژنتیکی گیاه با افزایش فعالیت آنزیم میـزان متابولیـت ثانویـه موردنظر را افزایش داد.

## منابع


1. Ahmadi Moghadam, Y., Piri, K.H., Bahramnejad, B., and Habibi, P. 2013. Methyl Jasmonate and Salicylic acid effects on the dopamine production in hairy cultures of *Portulaca oleracea* (purslan). Bull. Env. Pharmacol. Life. Sci. 2: 6. 89-94.
2. Andi, S., Taguchi, F., Toyoda, K., Shiraishi, T., and Ichinose, Y. 2001. Effect of methyl jasmonate on harpin induced hypersensitive cell death, generation of hydrogen peroxide and expression of PAL mRNA in tobacco suspension cultured by-2 cells. Plant Cell Physiol. 24: 2. 446-449.
3. Ayala-Zavala, J.F., Wang, S.Y., Wang, C.Y., and Gonzalez-Aguilar, G.A. 2005. Methyl jasmonate in conjunction with ethanol treatment increases antioxidant capacity, Volatile Compounds and Post Harvest life of straw berry fruit. Eur. Food Res. Technol. 221: 731-738.
4. Bagal, U.R., Leebens mack, J.H., Walter Lorenz, W., and Dean, J.F.D. 2012. The phenylalanine ammonia lyase (PAL) gene family shows a gymnosperm specific line age. BMC Genoms. 13: 3. 1471-2164.
5. Ceccarlli, N., Curadi, M., Picciarelli, P., Martelloni, L., Sbrana, C., and Giovannetti, M. 2010. Globe Artichoke as a functional food. Medit. J. Nutr. Metab. 3: 197-201.

6.Chang, C., Yang, M., Wen, H., and Chern, J. 2002. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. Food Drug Anal. 10: 178-182.
7.Chen, J.Y., Wen, P.F., Kong, W.F., Pan, Q.H., Zhan, J.C., Li, J.M., Wan S.B., and Huang, W.D. 2006. Effect of salicylic acid on phenyl propanoids and phenyalanine ammonia-lyase in harvested grape berries. Post-harvest Biol Technol. 40: 64-72.
8.Divya, P., Puthusseri, B., and Neelwarne, B. 2013. The effect of plant regulators on the concentration of caretonoids and phenolic compound in foliage of Coriander. Food Science and Technology *.http: //dx.doi/ .org/10. 1016/ j.lwt. 110-120.*
9.Dong, J., Wan, G., and Liang, Z. 2010. Accumulation of salicylic acid induced phenolic compounds and raised activities of secondary metabolic and antioxidant enzymes in Salvia miltorrhiza cell culture. J. Biotech. 148: 99-104.
10.Gonzata, Z., Aguilar, G.A., Tiznado-Hernandez, M.E., Zavaleta-Gatica, R., and Martinez-tellez, M.A. 2004. Methyl jasmonate treatments reduce chilling injury and activate the defense response of guava fruits. Biochem. Biophys. Res. Commun. 313: 694-701.
11.Gundluch, H., Muller, M.J., Kutchan, T.M., and Zenk, M.H. 1992. Jasmonic acid is a signal trancducer in elicitor induced plant cell Cultures. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 98: 2389-2393
12.Kang, H.M., and Salt Veit, M.E. 2003. Wound-induced increases in phenolic content of fresh-cut lettuce are reduced by a short immersion in aqueous hypertonic solution. Post Harvest Bio. Technol. 29: 271-277.
13.Lafuente, M.T., Sala, J.M., and Zacarias, L. 2004. Active oxygen detoxifying enzymes and phenylalanine ammonia.lyase in the ethylene induced chilling tolerance in citrus fruit. J. Agri. Food Chem. 52: 3606-3611.
14.Larrond, F., Gaudillere, J.P., Krisa, S., Decend, A., Deffieux, G., and Merillon, J.M. 2003. Airborne methyl jasmonate induces stilbene accumulation in leaves and berries of grapevine plants. Amr. J. Enol. Vitic. 54: 63-66.
15.Moungsrimuandee, B., Moriwaki, H., Nakayama, M., Nishigaki, S., and Yamamato, F. 2011. Effects of injection of etherl, Methyl jasmonate and Salicylates and Raffaelea Quercivora incubation on sapwood discoloration in Quercus Serrata. 32(1): 41-53.
16.Murashige, T., and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physio. Plant. 15: 473-497.
17.Popova, L., Ananieva, E., Hristova, V., Christov, K., Georgieva, K., Alexieva, V., and Stoinova, Zh. 2003. Salicylic Acid and Methyl Jasmonte induced protection on photosynthesis to paraquat oxidative stress. Bulg. J. Plant Physiol. 133-152.
18.Raman, V., and Ravi, S. 2011. Effect of Salicylic acid and methyl jasmonate on antioxidant systems of heamatococcus pluvialis. Acta Physiol Plant. 33: 1043-1049.

19. Rudell, D.R., and Matteis, J.P. 2002. Methyl Jasmonate enhances antocyanin accumulation and modifies production of phenolics and pigments in fuji apples. J. Amr. Soc. Hortic. Sci. 127: 435-441.
20. Sanchez-Sampedro, M.A., Fernandez-Tarrago, J., and Corchete, P. 2005. Yeast extract and methyl jasmonate induced silymarin production in cell cultures of *Silybum Marianum* L. Gaerth. J. Biotech. 119: 60-69.
21. Saunders, J.A., and Mcclure, J.W. 1974. The suitability of a quantitive spectrophotometric assay for phenylalanine ammonia lyase activity inbarely, buckwheat and pea seedlings. Plant Physiol. 54: 412-413.
22. Shabani, L., Ehsanpour, A.A., Asghari, G., and Emami, J. 2009. Glycyrrhizan production by in vitro cultured Glycyrrhiza glabra elicited by methyl jasmonate and salicylic acid. Russion J. Plant Physiol. 59: 5. 621-626.
23. Slinkard, K., and Singleton V.L. 1977. Total phenol analysis:automation and comparison with manual methods. Amr. J. Enol. Viti. 28: 49-55.
24. Szabo, E., Thelen, A., and Petersen, M. 1999. Fungal elicitor preparations and methyl jasmonate enhance rosmarinic acid accumulation in suspension cultures of *Cloeus blumei*. Plant Cell Rep. 18: 480-489.
25. Thulko, O., and Conrath, V. 1998. Salicylic acid has a dual role in the activation of defence-related genes in parsley. Plant J. 14: 35-42.
26. Walker, S., Bais, H., and Vivanco, M.J. 2002. Jasmonic acid induced hypercin production in cell suspension cultures of *Hypericum perforatum* L. (st. Johns wort). Phytochem. 60: 289-293.
27. Wang, K., Jin, P., Cao, S., Shang, H., Yang, Z., and Zheng, Y. 2009. Methyl jasmonate reduces decay and enhances antioxidant capacity in chines bay berries. J. Agric. Food Chem. 57: 5809-5850.
28. Wen, P.F., Chen, J.Y., Kong, W.F., Pan, Q.H., Wan, S.B., and Huang, W.D. 2005. Salicylic acid induced the expression of phenylalanine ammonia-lyase gene in grape berry. Plant Sci. 169: 928-934.
29. Wongwicha, W., Tanaka, H., Shoyama, Y., and Putalun, W. 2011. Methyl jasmonate elicitation enhances Glycyrrhizin production in *glycyrrhiza inflate* hairy roots culturs. Z., Natur Forsch. 66c: 423-428.
30. Yao, H., and Tian, S. 2005. Effect of pre and post harvest application of salicylic acid or methyl jasmonate on inducing disease resistance of sweet cherry fruit in storage. Postharvest Biol. Techno. 35(3): 253-262.
31. Ziaie, S.A., DastPak, A., NaghdBadi, S., PoorHoseini, L., Hemmati Moghadam, A., and Ghorori Naeini, M. 2005. Review on *Cynara Scolymus*. J. Med. Plant. 13: 10-13.

Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources
*J. Plant Prod. Res. Vol. 21 (4), 2014*
*http://jopp.gau.ac.ir*

# Investigation on phenylalanine ammonia-lyase activity of artichoke (*Cynara scolymus* L.) affected by methyl jasmonate and salicylic acid in in-vitro conditions

***S. Samadi[1], A. Ghasemnezhad[2] and M. Alizadeh[2]**
[1]M.Sc. Student, Dept. of Horticulture Science, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, [2]Assistant Prof., Dept. of Horticultural Science, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources
Received: 02/04/2014 ; Accepted: 08/27/2014

**Abstract**

The present research designed to evaluate effect of SA and MeJA elicitation on accumulation of phenolic compounds, flavonoids and PAL enzyme activity in artichoke. Result showed that, when elicitors applied to cell culture, phenol and flavonoids significantly increased and an increase in PAL activation was observed. Application of MeJA at 100µM and SA at 200µM had most effectiveness on production of phenyl propanoides compounds. The maximum production of measured secondary metabolites was observed in samples in which were treated with 50 µM SA+ 50 µM MeJA as well as 100 µM SA + 50 µM MeJA. A positive correlation between PAL enzyme activity and phenolic compounds accumulation leads PAL may be the key enzyme for the biosynthesis of phenolic compounds and flavonoids in artichoke. Based on the obtained results in which indicated that PAL as the first and most important enzyme in poly phenolic compounds production, influenced by executed treatments. Optimization the elicitor concentrations could lead to desirable secondary metabolite production of artichoke in in-vitro conditions.

***Keyworlds:*** Flavonoids, Methyl Jasmonate, Phenylalanine ammonia lyase (PAL), Salicylic Acid, Total Phenol

*Corresponding author; soghra.samadi@yahoo.com